A copy of Korean Laid-open Patent
Publication No. 2000-0007623

(19)대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(51) Int. Cl. 6
C12N 1/20

(11) 공개번호 특2000-0007623
(43) 공개일자 2000년02월07일

(21) 출원번호 10-1998-0027045
(22) 출원일자 1998년07월06일

(71) 출원인 주식회사 한국야쿠르트 이은선
서울시 서초구 잠원동 28-10

(72) 발명자 김현욱
경기도 수원시 권선구 매산로2가 4-3
백영태
경기도 수원시 권선구 서둔동 28-5

(74) 대리인 이종현
김영재

심사청구 : 없음

(54) 내산성 및 생장속도가 높고 혈중 콜레스테롤저하능이 우수한 젖산균

요약

본 발명은, 건강한 한국 성인의 분변에서 분리한 내산성, 담즙산 내성 및 혈중 콜레스테롤 저하능이 우수하고 생장 속도가 빠른 젖산균인 락토바실러스 애시도필러스 SNUL 01균주에 관한 것으로, 본 발명의 균주는 내산성과 담즙산 내성 및 혈중 콜레스테롤 저하와 관련된 특성이 우수하고 생장속도가 빠르기 때문에, 본 발명의 균주는 소화기관에서의 생존율이 높으며, 특히 본 발명의 균주는 건강한 한국 성인의 분변에서 분리한 것이어서 한국인의 장내 정착할 가능성이 높다. 따라서, 본 발명의 균주 또는 균주를 배양한 배양물이나 발효식품을 섭취하였을 때, 정장 효과 및 콜레스테롤 저하 효과를 기대할 수 있다

대표도

도 1

명세서

도면의 간단한 설명

도 1은 실시예 1과 비교예 1 및 2의 내산성 시험(1)의 결과를 보인 그래프,

도 2는 실시예 2와 비교예 3 내지 5의 내산성 시험(2)의 결과를 보인 그래프,

도 3a 내지 도 3d는 실시예 3과 비교예 6 내지 8의 담즙산 내성 시험의 결과를 보인 그래프,

도 4는 실시예 5와 비교예 13 내지 14의 생장 시험의 결과를 보인 그래프,

도 5는 실시예 6과 비교예 15 및 16의 탈지유에서의 생장 시험의 결과를 보인 그래프

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

본 발명은 내산성 및 담즙산 내성이 우수하여 인체의 소화 장기에서의 생존력이 뛰어나고, 혈중 콜레스테롤 저하 능력이 우수하며, 생장속도가 빠른 새로운 젖산균에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 상술한 우수한 특성을 나타내는 락토바실러스 애시도필러스에 관한 것이다.

젖산균은 동물의 장내에 분포하여 유해 미생물 성장의 억제, 이상 발효의 저해, 혈중 콜레스테롤 저하, 면역 기능의 증진 등의 효과를 나타내며, 항암 작용도 있는 것으로 보고되고 있다

이러한 젖산균을 사람이 섭취하여 건강을 증진할 수 있도록 발효 유제품이 상품화되어 널리 음용 또는 식용되고 있다. 발효 유제품에 사용되는 대표적인 균주로는 락토바실러스 애시도필러스(L. acidophilus), 락토바실러스 카세이(L. casei), 락토바실러스 불가리쿠스(L. bulgaricus), 스트렙토코커스 써모필러스(Str. thermophilus) 등이 있다.

젖산균이 인체에 유용한 효과를 나타내려면 소화기관을 통과하는 과정에서 생존하여 소장에 정착될 수 있어야 한다. 따라서, 위장에서 분비되는 산 및 소장에서 분비되는 담즙산에 대한 내성이 높을수록 젖산균이 이들 소화기관의 가혹한 환경에서 생존하여 소장에 도달하는 생균수가 많아지기 때문에, 이러한 성질을 갖는 젖산균을 사용하여 발효제품을 제조하였을 때 실질적으로 인체에 유용한 기능을 할 수 있는 것이다

그러므로, 발효 유제품에 사용되는 젖산균에 요구되는 성질로서 내산성 및 담즙산 내성이 중요한 문제가 되어 왔으며, 이러한 특성이 우수한 균주를 분리, 개발하려는 노력이 다각도로 시도되고 있다.

한편, 젖산균이 지속적으로 유용한 기능을 하기 위해서는 상술한 내산성 및 담즙산 내성 이외에 장내에서의 정착율이 높아야 한다. 그러나, 젖산균은 숙주 특이성을 나타내기 때문에, 사람을 위한 발효제품을 위해서는 사람으로부터 분리한 젖산균이 실제로 인체내에 정착하여야 소기의 효과를 얻을 수 있다.

또한, 젖산균은 현대인의 성인병, 특히 순환계 계통의 질환에 유해한 것으로 알려진 혈중 콜레스테롤을 저하시키는 효과도 있기 때문에, 이러한 특성이 우수한 젖산균을 개발하는 것이 요구되고 있다.

발명이 이루고자하는 기술적 과제

따라서, 본 발명의 목적은, 내산성 및 담즙산 내성이 높고 생장속도가 빠르며, 인체의 혈액내 콜레스테롤을 저하시키는 능력이 우수한 새로운 젖산균을 제공하는 것이다.

본 발명의 다른 목적은, 인체에 섭취되었을 때 유용한 특성을 나타내는 락토바실러스 애시도필러스(락토바실러스 애시도필러스 SNUL 01)를 제공하는 것이다.

본 발명의 또다른 목적은, 한국인에 적합한 새로운 젖산균을 제공하는 것이다.

본 발명의 또다른 목적은, 락토바실러스 애시도필러스 SNUL 01을 이용하여 제조한 발효제품을 제공하는 것이다.

본 발명의 또다른 목적은, 락토바실러스 애시도필러스 SNUL 01을 이용하여 제조한 정장제를 제공하는 것이다.

발명의 구성 및 작용

젖산균은 인간의 구강, 장, 질, 분변 등에 널리 분포한다. 따라서, 이들로부터 젖산균을 분리하여 그 특성을 시험함으로써 원하는 성질을 갖는 젖산균을 획득하는 방법이 행해지고 있으며, 특히 분변으로부터 젖산균을 분리하는 방법이 유용하게 사용되고 있다.

본 발명에서는 숙주 특이성을 고려하여, 한국인을 위한 발효제품에 사용되는 젖산균으로서 한국인의 인체로부터 젖산균을 분리함으로써, 상기한 숙주 특이성의 관계에서 젖산균의 유용한 효과를 극대화할 수 있는 것이다.

본 발명자들은 이러한 점을 고려하여 한국인의 생리에 맞는 발효제품을 제조하는데 적합한 균주를 분리하고자 한국 성인들로부터 젖산균을 분리하여 시험하던 중, 내산성, 담즙산 내성, 혈중 콜레스테롤 저하능이 우수하고 생장속도가 빠른 새로운 젖산균을 분리하는데 성공하여 본 발명에 도달하였다

본 발명에 따른 균주를 분리하기 위하여 건강한 한국인 성인의 분변을 0.02 % 소디움 아자이드(sodium azide)가 포

함된 엠알에스(MRS) 액체 배지에 넣고 37 ℃에서 24시간 배양하였다. 배양후 10 μ 백금이를 사용하여 배양액을 취하여 다시 0.02 % 소디움 아자이드가 포함된 엠알에스 한천 평판배지에 도말하고 37 ℃에서 48 시간동안 배양하였다. 형성된 콜로니중에서 내산성 및 담즙산 내성을 시험하여 본 발명의 균주를 분리하였다. 본 발명의 젖산균은 1998. 7. 3. 자로 한국종균협회에 기탁되었다(수탁번호: KFCC-11041).

본 발명에 따른 젖산균의 특성은 다음과 같다.

1) 균의 형태엠알에스(MRS) 한천평판배지에서 37 ℃, 2일간 배양했을 때 균의 형태(1) 세포의 형태: 간균(2) 운동성: 없음(3) 포자형성능: 없음(4) 그람(Gram) 염색: 양성2) 균총의 형태엠알에스(MRS) 한천평판배지에서 37 ℃, 2일간 배양했을 때 균총의 형태(1) 형상: 원형 (2) 융기: 볼록(3) 표면, 거침(rough)3)생리적 성질(1) 생육온도 : 생장가능 생육온도: 25 ~ 45 ℃ 최적 생장온도: 37 ~ 40 ℃ (2) 생육 pH: 생장가능 생육 pH: 5.0 ~ 7.5

최적 pH 6.0 ~ 6.5

(3) 산소에 대한 영향: 통성혐기성4) 카탈라제: -5) 가스형성여부: -6) 15 ℃에서 생육 : -7) 45 ℃에서 생육: +8) 인돌생산 -9) 젖산생산: +10) Bergey's manual의 당 발효 시험 아미그달린: +아라비노스: -셀로비오스: +에스쿨린: +과당: +갈락토스: +포도당: +글루코네이트: -유당: +말토스: +만니톨: -만노스: +멜레지토스: -멜리비오스: -라피노스: +리보스: -람노스: -살리신: -소르비톨: -서당: +트레할로스: +자일로스: -이와 같은 균의 형태학적, 생리적 및 생장 특성에 근거하여 본 발명의 균주는 락토바실러스 애시도필러스로 동정하였고, 본 발명자들은 이를 락토바실러스 애시도필러스 SNUL 01로 명명하였다.

본 발명의 젖산균은 배양물 또는 동결건조된 분말 형태로 제공될 수 있다. 이와 같이 본 발명의 젖산균 자체 또는 본 발명의 균주를 이용하여 당 또는 단백질을 발효시킴으로써 얻어지는 본 발명의 균주가 포함된 배양물은, 정장 효과가 기대되므로 정장제로 사용될 수 있는 것이다. 특히 널리 식용되는 요구르트나 치즈 등의 발효식품을 본 발명의 균주를 사용하여 제조할 수 있다.

이하 실시예 및 비교예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명한다. 이들 실시예 및 비교예에서 사용된 MRS 배지 및 MRS 한천 평판배지의 조성은 각각 다음 표 1 및 2와 같다.

[표 1]

MRS 배지의 조성

프로테오스 펩톤 No. 3	10 g
육 추출물	10 g
효모 추출물	5 g
포도당	20 g
트윈 80(Tween 80)	1 g
암모니움 시트레이트	2 g
소디움 아세테이트	5 g
황산마그네슘(MgSO4.7H2O)	0.1 g
황산망간(MnSO4.4H2O)	0.05 g
인산칼륨(dibasic)	2 g
증류수	1000 ml

[표 2]

MRS 한천 평판배지

MRS 배지	100 ml
한천	1.5 g

실시예 1: 내산성 시험(1)MRS 액체배지에 0.2% 소디움 티오글리콜레이트(sodium thioglycollate)를 첨가하여 MRS 티오(MRS Thio)배지를 조성하였다. 이 배지에 본 발명의 락토바실러스 애시도필러스 SNUL 01 균주를 접종하여 37 ℃에서 24시간 배양하였다. 이 배양물에 멸균한 1.25 N 염산 용액을 첨가하여 배지를 pH 2로 조절하였다. 배지를 계속해서 37℃에서 배양하면서 30분 간격으로 시료를 채취하였다.

멸균한 0.1% 펩톤 용액 8.5 ㎖와 0.5 N NaOH 용액 0.5 ㎖의 혼합용액으로 채취한 시료를 중화 및 희석시킨 후, 0.1 % 펩톤 용액 9 ㎖으로 연속 희석하였다. 희석된 시료를 MRS 한천 평판배지에 접종시킨 37 ℃에서 2일간 배양하여 형성된 균락수를 세어 생균수를 측정하였다.

비교예 1 및 2: 내산성 시험(1)상기 실시예와 동일한 방법 및 조건으로 공시 균주인 락토바실러스 애시도필러스 145(WIESBY, Germany) 및 락토바실러스 애시도필러스 NCFM (MARSCHALL, USA) 균주의 내산성을 시험하여 비교예 1 및 2로 하였다. 실시예 1, 비교예 1 및 비교예 2의 결과를 표 1에 나타냈다

실시예 2: 내산성 시험(2)본 발명의 락토바실러스 애시도필러스 SNUL 01을 MRS 액체배지에 접종하여 37 ℃에서 18시간 배양한 후, 원심분리기를 사용하여 20분간 원심분리(3,000×g)함으로써 균체를 회수하였다. 회수된 균체를 생리적 식염수에 현탁시켜 만들어진 현탁액을 생리적 식염수로 희석하였다.

10 % 염산을 첨가하여 pH를 2로 조절한 0.05 M 멸균 인산완충액을 상기 현탁액에 가하여 10 cfu/㎖가 되도록 하였다. 다시 37℃로 배양하면서, 매시간마다 균액을 채취하여 희석하고 MRS 한천 평판배지에 접종하고 37℃에서 2일간 배양하여 형성된 균락수를 세어 생균수를 측정하였다

비교예 3 내지 5: 내산성 시험(2)상기 실시예 2와 동일한 방법 및 조건으로 공시 균주인 락토바실러스 애시도필러스 CH-5(CHR. HANSEN'S LAB., A/S DENMARK), 락토바실러스 애시도필러스 145 및 락토바실러스 애시도필러스 NCFM 균주에 대해 내산성을 시험하여 비교예 3 내지 5로 하였다. 실시예 2, 비교예 3 내지 5의 결과를 표 2에 나타냈다

실시예 3: 담즙산 내성 시험MRS 액체배지에 옥스갈(oxgall, Difco 제조)을 최종 농도가 0 %, 0.1 %, 및 0.5 %가 되도록 첨가한 후 락토바실러스 애시도필러스 SNUL 01을 1 % 접종하여 37 ℃에서 배양하였다. UV VISIBLE 스펙트로포토미터(UV-1601, SHIMADZU, Co. Japan)를 사용하여 620 ㎚에서 흡광도를 측정하였다

비교예 6 내지 8: 담즙산 내성 시험상기 실시예3과 동일한 방법 및 조건으로 공시 균주인 락토바실러스 애시도필러스 CH-5, 락토바실러스 애시도필러스 145 및 락토바실러스 애시도필러스 NCFM 균주에 대해 담즙산 내성을 시험하여 비교예 6 내지 8로 하였다. 실시예 3, 비교예 6 내지 8의 결과를 도 3a 내지 도 3d에 나타냈다.

실시예 4: 콜레스테롤 제거 능력 시험 0.3 % 옥스갈(oxgall, Difco)과 0.2 %의 티오글리콜산 및 콜레스테롤(Water soluble cholesterol, Sigma, Co., 100㎍/㎖)이 함유된 엠알에스(MRS) 액체배지에 본 발명의 락토바실러스 애시도필러스 SNUL 01을 1 % 접종하였다. 37 ℃에서 24시간 배양한 후 배지내에 남아있는 콜레스테롤의 함량을 루델과 모리스(Rudel & Morris, J. Lipid Research, 1973, 14:364-366)의 방법으로 측정하였다.

비교예 9 내지 11상기 실시예 4와 동일한 조건 및 방법으로 공시 균주인 락토바실러스 애시도필러스 ATCC 43121, 락토바실러스 애시도필러스 CH-5 및 락토바실러스 애시도필러스 145 균주에 대해 콜레스테롤 제거 능력의 시험을 측정하였다.

상기 실시예 4와 비교예 9 내지 11의 결과는 다음 표 3에 표시한다.

/표3/

콜레스테롤 제거량

	균주명	배양 후 콜레스테롤 제거량(%)
실시예 4	SNUL 01	41.17
비교예 9	ATCC 43121	24.85
비교예 10	CH-5	28.4
비교예 11	145	24.85

실시예 5: MRS 액체배지에서의 생장 시험멸균된 MRS 액체배지에 본 발명에 따른 락토바실러스 애시도필러스 SNUL 01을 약 10^6 cfu/㎖ 접종하여 37 ℃에서 24시간 배양하였다. 배양 시간의 경과에 따른 생균수의 변화는 희석된 시료를 MRS 한천 평판배지에 접종하고 37℃에서 2일간 배양하여 형성된 균락수를 세어 생균수를 측정하였다.

비교예 12 내지 14상기 실시예 5와 동일한 방법 및 조건으로 공시 균주인 락토바실러스 애시도필러스 CH-5, 락토바실러스 애시도필러스 145 및 락토바실러스 애시도필러스 NCFM을 배양한 후 생균수를 측정하였다. 상기 실시예 5 및 비교예 12 내지 14의 결과를 도 4에 나타낸다.

실시예 6. 우유에서의 생장 시험 12 %의 멸균 환원탈지유에 본 발명의 락토바실러스 애시도필러스 SNUL 01을 1 % 농도로 접종하여 37 ℃에서 24시간 배양하면서 MRS 한천 평판배지에 접종하고 37 ℃에서 2일간 배양하여 형성된 집락수를 세어 생균수를 측정하였다.

비교예 15 및 16 상기 실시예 6과 동일한 방법 및 조건으로 공시 균주인 락토바실러스 애시도필러스 CH-5 및 락토바실러스 애시도필러스 NCFM을 배양한 후 생균수를 측정하였다. 상기 실시예 6 및 비교예 15 및 16의 결과를 도 5에 나타냈다.

[illegible]

이상의 실험 및 실시예로부터 언급한 바와 같이, 본 발명에 따른 락토바실러스 애시도필러스 SNUL 01은 내산성과 담즙산 내성 및 콜레스테롤 저하능이 높고 생육속도가 빠른 특성이 있다. 따라서, 본 발명의 균주를 포함하는 음식물을 섭취하였을 때 소장에까지 도달하는 살아있는 균의 생존율이 종래의 균주보다 높으며, 특히 본 발명의 균주는 건강한 한국인의 생체에서 분리한 것이기 때문에 한국인의 장내 정착할 가능성이 높다.

그러므로, 본 발명의 균주 또는 균주를 배양한 배양물이나 발효식품을 식용하였을 때, 정장 효과 및 콜레스테롤 저하 효과를 기대할 수 있다.

(57) [illegible]

청구항1

한국인의 분변에서 분리한 내산성, 담즙산 내성 및 혈중 콜레스테롤 저하능이 우수하고 생육 속도가 빠른 젖산균

청구항2

제 1 항에 있어서, 락토바실러스 애시도필러스 SNUL 01(수탁번호: KFCC-11041)임을 특징으로 하는 젖산균.

청구항3

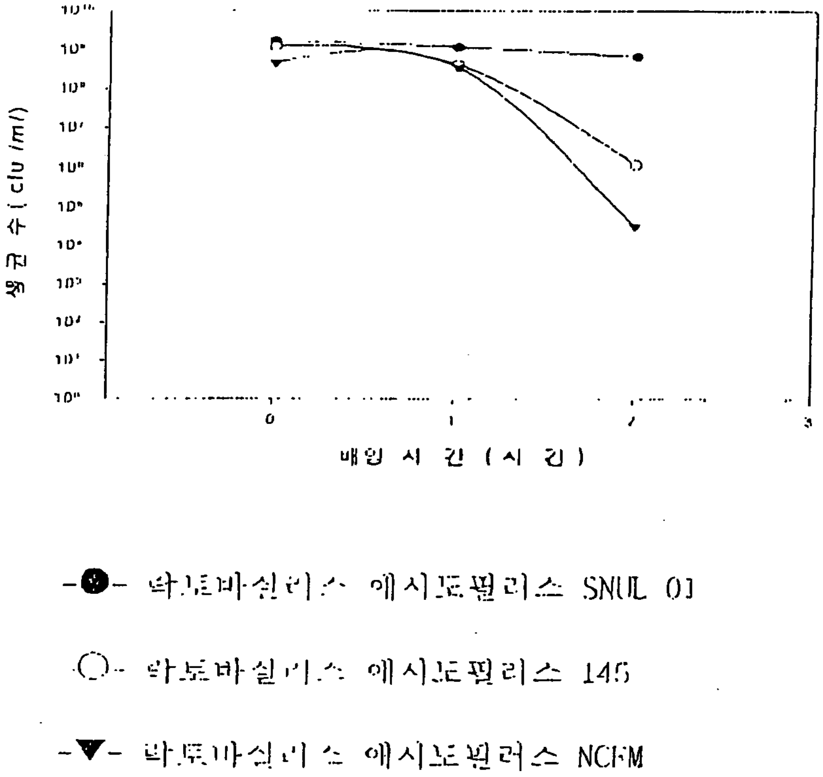
제 1 항에 따른 균주를 이용하여 발효시킨 발효식품.

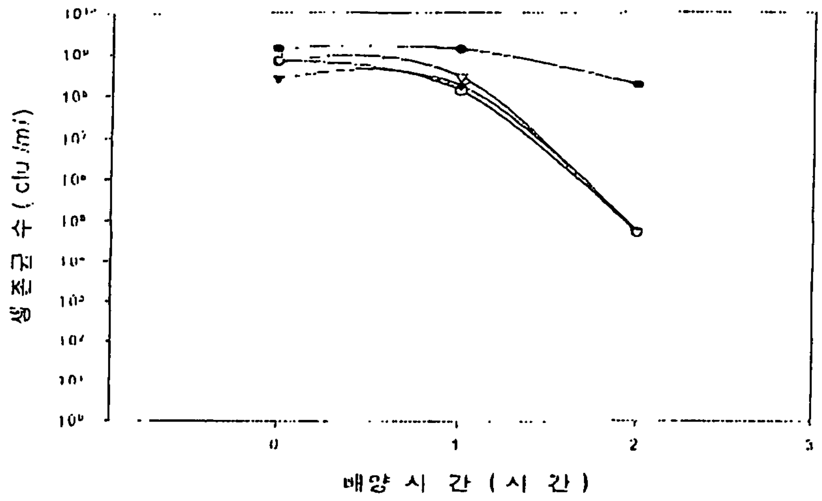
청구항4

제 1 항의 균주를 포함하는 정장제.

[illegible]

[illegible]


생균수 (cfu/ml)
10¹⁰
10⁹
10⁸
10⁷
10⁶
10⁵
10⁴
10³
10²
10¹
10⁰
0
1
2
3
배양 시간 (시간)
-●- 락토바실러스 애시도필러스 SNUL 01
○- 락토바실러스 애시도필러스 145
-▼- 락토바실러스 애시도필러스 NCFM

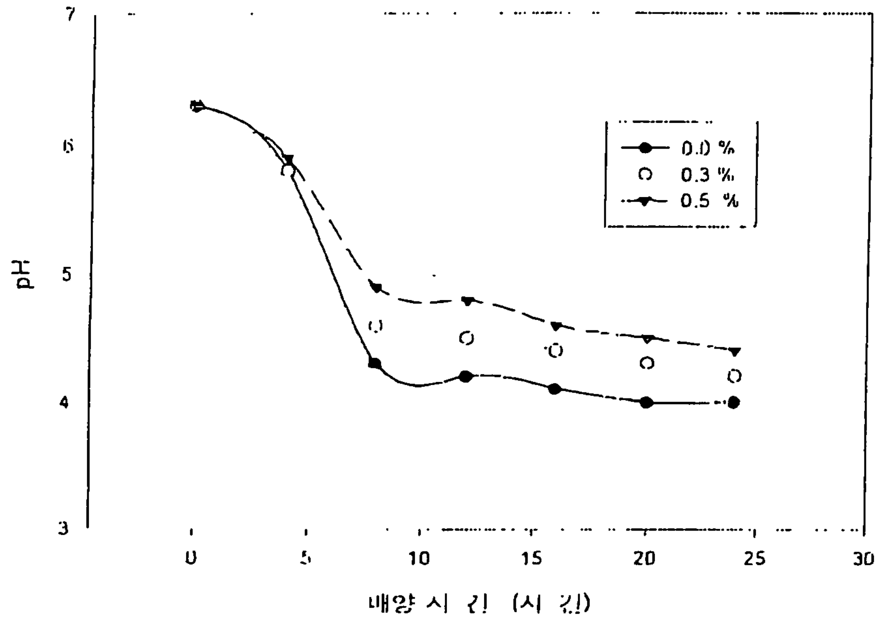


-●- 락토바실러스 애시도필러스 SNUL 01

-○- 락토바실러스 애시도필러스 CH-5

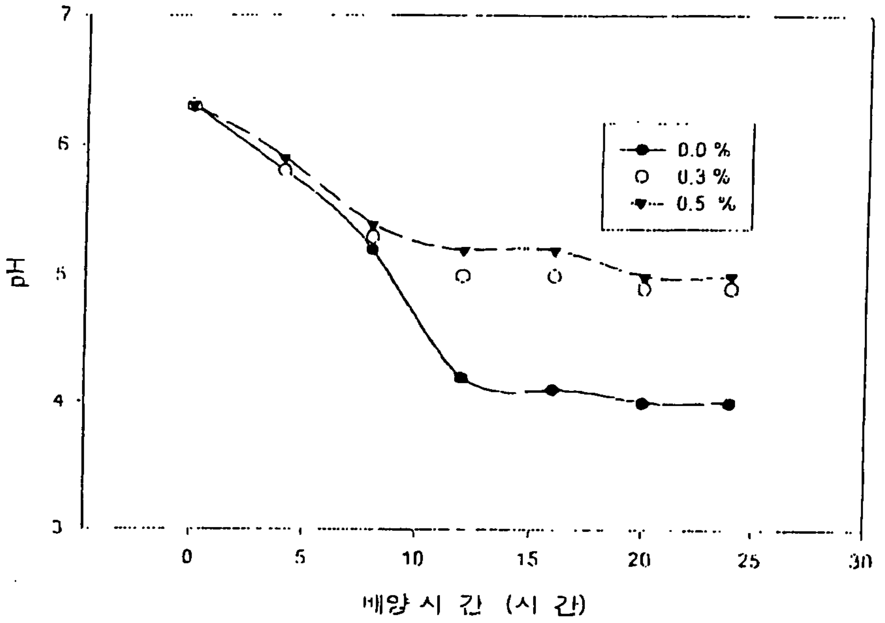
-▼- 락토바실러스 애시도필러스 145

-▽- 락토바실러스 애시도필러스 NCFM

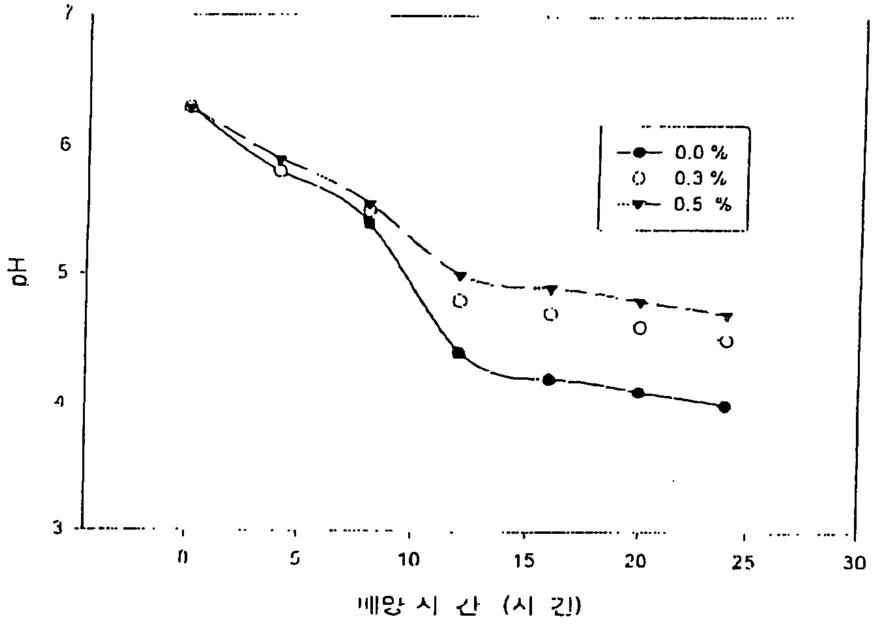


락토바실러스 에시도필러스 SNUL 01

[illegible]

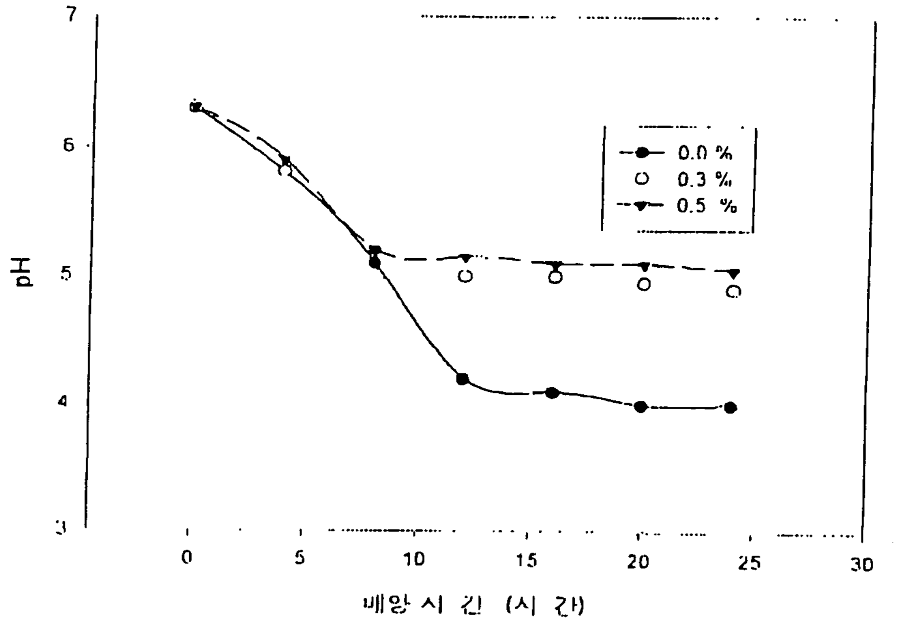


락토바실러스 애시도필러스 CH-5



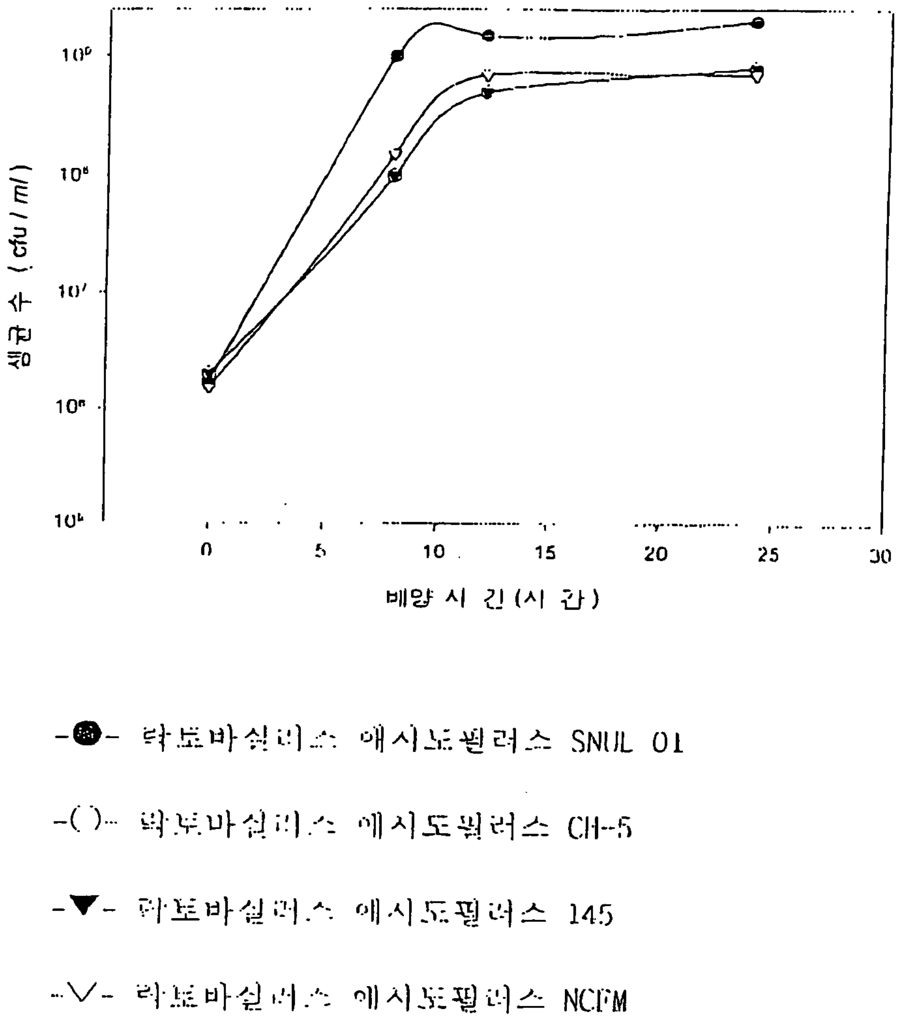
락토바실러스 에시도필러스 145

[illegible]

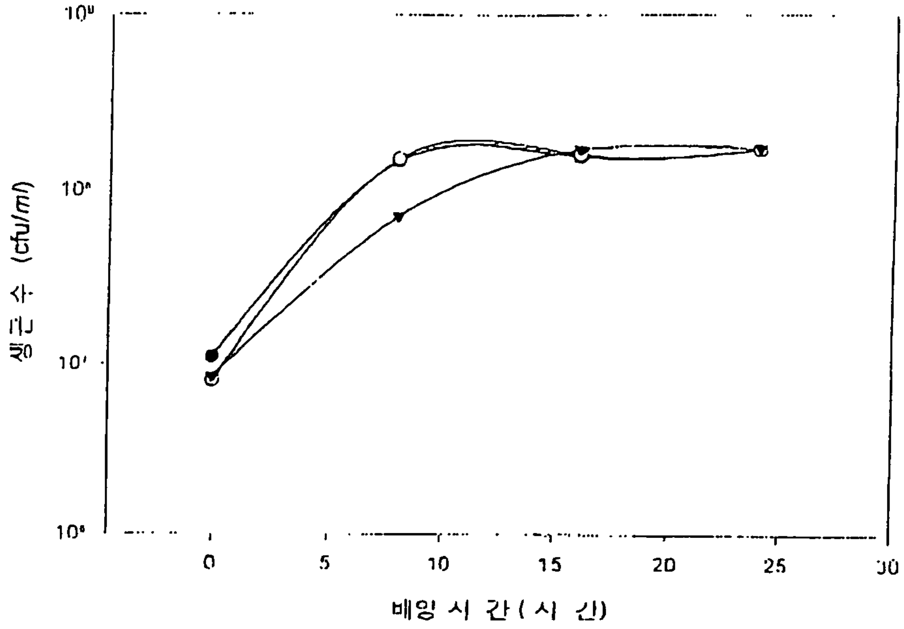


락토바실러스 애시도필러스 NCFM

[illegible]


생균 수 (cfu / ml)
10⁹
10⁸
10⁷
10⁶
10⁵
0
5
10
15
20
25
30
배양 시 간 (시 간)
-●- 락토바실러스 에시도필러스 SNUL 01
-○- 락토바실러스 에시도필러스 CH-5
-▼- 락토바실러스 에시도필러스 145
-▽- 락토바실러스 에시도필러스 NCFM

[illegible]



-●- 락토바실러스 애시도필러스 SNUL 01

-○- 락토바실러스 애시도필러스 CH-5

-▼- 락토바실러스 애시도필러스 NCFM

(19) Korea Intellectual Property Office(KR)
(12) Patent Laid-open Publication Bulletin(A)

(51) Int. Cl. ^{6}
C12N 1/20

(11) Publication No. Pat.2000-0007623
(43) Publication date : 2000. 02. 07

(21) Application No. :	10-1998-0027045
(22) Filing date :	1998. 07. 06
(71) Applicant :	Korea Yakult Co., Ltd. LEE Eun Sun 28-10, Jamwon-dong, Seocho-gu, Seoul
(72) Inventors :	KIM Hyun Wook 4-3, Maesanro-2-ga, Kwonsun-gu, Suwon-si, Kyunggi-do Ahn Young Tae 28-5, Seodun-dong, Kwonsun-gu, Suwon-si, Kyunggi-do
(74) Patent Attorney :	PARK Jong Hyun, Lim Young Hee

Request for Examination : Yes

(54) Lactic acid bacteria having a high acid resistance and growth rate, and an excellent activity for lowering blood cholesterol level

ABSTRACT

The present invention relates to Lactobacillus acidophilus strain SNUL 01 isolated from the feces of a healthy Korean adult, which has an excellent acid and bile acid resistance. The strain of the present invention also has an excellent activity for lowering blood cholesterol level, and shows a high growth rate. Owing to these excellent properties, the inventive strain shows a high survival rate in the digestive organ. Further, the inventive strain has a higher possibility of settling in the intestine of Korean because it has been isolated from the feces of Korean adult. Therefore, the inventive strain and culture fluid or fermentation food containing the same are expected to have the effect of curing an intestine disorder and reducing blood cholesterol level.

REPRESENTATIVE DRAWING

Fig. 1

SPECIFICATION

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

FIG. 1 is a graph showing the result of the acid resistance tests of Example 1 and Comparative Examples 1 and 2,

FIG. 2 is a graph showing the result of the acid resistance tests of Example 2 and Comparative Examples 3 to 5,

FIGs. 3a to 3d are graphs showing the results of the bile resistance tests of Example 3 and Comparative Examples 6 to 8,

FIG. 4 is a graph showing the result of the growth tests of Example 5 and Comparative Examples 12 to 14, and

FIG. 5 is a graph showing the result of the growth tests in skim milk of Example 6 and Comparative Examples 15 and 16.

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

Object of the Invention

Field of the Invention and Prior art

The present invention relates to a newly isolated lactic acid bacterium showing an excellent survival rate in the digestive organ owing to its excellent acid and bile acid resistance, effective lowering of blood cholesterol level and a high growth rate. More particularly, it pertains to *Lactobacillus acidophilus* strain exhibiting the above-mentioned excellent properties.

Lactic acid bacteria are helpful to host animals in that they inhibit the growth of pathogenic microorganisms, treat abnormal fermentation in the intestine, lower blood cholesterol level, enhance immune activity, and provide an anticancer activity.

Various fermented dairy products have been developed to serve these advantageous lactic acid bacteria. Representative lactic acid bacteria conventionally employed in tne production of the fermented dairy products include *Lactobacillus acidophilus, Lactobacillus casei, Lactobacillus bulgaricus, Streptococcus thermophilus.*

To function as they are supposed to, the lactic acid bacteria should settle in the small intestine after they survive through the digestive tract. Accordingly, lactic acid bacteria having a high acid and bile acid resistance can be effective in manufacturing fermented dairy products since many of them will survive the severe environment of the digestive tract and reach the small intestine with their excellent resistance against the acid and bile acid secreted in the stomach and the small intestine, respectively.

Therefore, various attempts have been made to develop a lactic acid bacterial strain having an excellent acid and bile acid resistance.

Meanwhile, in order to maintain their advantageous functions, the lactic acid bacteria need to have a high rate of settlement in the intestines. However, due to the host-specificity of the lactic acid bacteria, a desired effect can be achieved from the fermentation product intake only when the lactic acid bacteria actually originate in human and settle in the intestines thereof.

Further, the lactic acid bacteria are also known to have an activity of lowering blood cholesterol level and high blood cholesterol level is known to cause a disease related to the circulatory system. Accordingly, there has been a need to develop a lactic acid bacteria strain having an excellent activity of lowering blood cholesterol level

TECHNICAL OBJECT OF THE INVENTION

Accordingly, it is an object of the present invention to provide a novel lactic acid bacteria strain having a high acid and bile acid resistance, high growth rate, and effective lowering of blood cholesterol level.

It is another object of the present invention to provide a *Lactobacillus acidophilus* strain (*Lactobacillus acidophilus* SNUL 01) which presents useful properties when taken by a human body.

It is a further object of the present invention to provide a novel lactic acid bacteria strain appropriate for Korean.

It is a still further object of the present invention to provide a fermentation product prepared by using *Lactobacillus acidophilus* SNUL 01.

It is a still further object of the present invention to provide a medicine for intestinal disorder employing *Lactobacillus acidophilus* SNUL 01.

CONSTITUTION AND OPERATION OF THE INVENTION

Lactic acid bacteria reside in, e.g., oral cavity, intestines, vagina and feces of a human. Accordingly, a lactic acid bacteria strain having a desired property is selected by testing bacteria obtained from the samples of a human body. Specifically, human feces are useful in isolating a lactic acid bacteria strain.

In the present invention, a lactic acid bacteria strain is isolated from the body of Korean as a lactic acid bacteria strain for the preparation of a fermentation product for Korean, thereby maximizing the useful effects of the lactic acid bacteria in the context of its host specificity.

The present inventors have endeavored to develop a lactic acid bacteria strain suitable for the preparation of a fermentation product appropriate for Korean, and have achieved the present invention by isolating a novel lactic acid bacteria strain which has excellent acid and bile acid resistance and excellent activity for lowering blood cholesterol level, and shows a high growth rate.

In order to isolate the inventive strain, the feces of a healthy Korean adult was cultured in MRS medium containing 0.02% sodium azide at 37℃ for 24 hours. Then, the culture was taken with a 10μ loop, spread on a plate having MRS agar medium containing 0.02% sodium azide and cultured at 37℃ for 48 hours. The colonies formed on the plate were tested for acid and bile acid resistance to isolate the inventive strain. The inventive lactic acid bacteria strain was deposited with Korean Federation of Culture Collection on July 3, 1998 (Accession No.: KFCC-11041).

The properties of the inventive lactic acid bacteria strain are as follows:

1) Shape
Shape of bacteria when cultured on MRS agar medium at 37℃ for 2 days
① Shape of cell: rod
② Motility: non
③ Sporulation: non
④ Gram staining: positive
2) Colony morphology
Morphology of colonies when cultured on MRS agar medium at 37℃ for 2 days

① Shape: circular
② Protrusion: bulge
③ Surface: rough
3) Physiological property
① Growth temp. : possible growth temp. : 25-45℃
optimal growth temp.: 37-40℃
② Growth pH: possible growth pH: 5.0-7.5
optimal growth pH: 6.0-6.5
③ Oxygen requirement: facultative anaerobic
4) Catalase: -
5) Gas formation: -
6) Growth at 15℃: -
7) Growth at 45℃: +
8) Indole production: -
9) Lactic acid production: +
10) Sugar fermentation test of Bergey's manual
Amygdaline: -
Arabinose: -
Cellobiose: +
Esculin: +
Fructose: +
Galactose: +
Glucose: +
Gluconate: -
Lactose: +
Maltose: +
Mannitol: -
Mannose: +
Melesitose: -
Melibiose: -
Raffinose: +
Ribose: -
Rhamnose: -
Salicine: -
Sorbitol: -
Sucrose: +

Trehalose: +
Xylose: -

In considering the above morphological, physiological and growth properties, the inventive strain was identified as *Lactobacillus acidophilus*. The present inventors have designated the strain as *Lactobacillus acidophilus* SNUL 01.

The lactic acid bacteria of the present invention can be provided in the form of a culture of a lyophilized powder. The inventive bacteria strain itself, or a culture containing the same, which is obtained by fermenting a sugar or protein with the inventive strain, is expected to exhibit a curing effect for intestinal disorder and, accordingly, can be used as a medicine for intestinal disorder. Specifically, fermentation products such as yogurt and cheese can be prepared by employing the inventive strain.

The present invention will be explained in more detail with reference to the following Examples and Comparative Examples. The compositions of MRS medium and MRS agar medium are shown in Tables 1 and 2, below.

[Table 1] Composition of MRS medium

Proteose peptone No. 3	10 g
Meat extract	10 g
Yeast extract	5 g
Glucose	10 g
Tween 80	1 g
Ammonium citrate	2 g
Sodium acetate	5 g
Magnesium sulfate ($MgSO_4.7H_2O$)	0.1 g
Maganese sulfate ($MnSO_4.4H_2O$)	0.05 g
Potassium phosphate (dibasic)	2 g
Distilled water	1000 ml

[Table 2] Composition of MRS agar medium

MRS medium	100 ml
Agar	1.5 g

Example 1: Acid resistance test (1)

0.2 % sodium thioglycolate was added to MRS liquid medium to obtain MRS Thio medium. *Lactobacillus acidophilus* SNUL 01 of the present invention was inoculated in MRS Thio medium and cultured at 37℃ for 24 hours. Sterilized 1.25 N HCl solution was added to the culture to adjust it to pH 2. While continuing the culture at 37℃, aliquots of the culture were taken as samples at intervals of 30 min.

A mixture of 8.5 ml of sterilized 0.1 % peptone solution and 0.5 ml of 0.5N NaOH solution was added to the samples to neutralize and dilute the samples, respectively. The samples were serially diluted with 9 ml of 0.1 % peptone solution. The diluted samples were inoculated on MRS agar medium and cultured at 37℃ for 2 days. The number of live cells was determined by counting the colonies formed on the medium.

Comparative Examples 1 and 2: Acid resistance test (1)

As Comparative Examples 1 and 2, the procedure of Example 1 was repeated using *Lactobacillus acidophilus* 145 (WIESBY, Germany) and *Lactobacillus acidophilus* NCFM (MARSCHALL, USA) to test the acid resistance of the test strains.

The results of Example 1 and Comparative Examples 1 and 2 are shown in Fig. 1.

Example 2: Acid resistance test (2)

Lactobacillus acidophilus SNUL 01 of the present invention was inoculated in MRS liquid medium and cultured at 37℃ for 18 hours, and the resulting culture was centrifuged at 3000 xg for 20 min to recover the bacterial cells. The cells were suspended in physiological saline and the resulting suspension was diluted with physiological saline.

Sterilized 0.05 M phosphate buffer adjusted to pH 2 with the addition of 10 HCl was added to the suspension so that the concentration of bacterial cell became 10 cfu/ml. The culture was continued at 37℃ and aliquots of the culture was taken every hour and diluted. The dilutions were inoculated on MRS agar medium and cultured at 37℃ for 2 days. The number of live cells was determined by counting the colonies formed on the medium.

Comparative Examples 3 to 5: Acid resistance test (2)

As Comparative Examples 3 to 5, the procedure of Example 2 was repeated using *Lactobacillus acidophilus* CH-5 (CHR, HANSEN'S LAB., A/S DENMARK), *Lactobacillus acidophilus* 145 and *Lactobacillus acidophilus* NCFM to test the acid resistance of the test strains.

The results of Example 2 and Comparative Examples 3 to 5 are shown in Fig. 2.

Example 3: Bile acid resistance test

Oxgall (Difco) was added to MRS liquid medium to final concentrations of 0 %, 0.3 % and 0.5 %, respectively, and *Lactobacillus acidophilus* SNUL 01 inoculated thereto at a concentration of 1 % and cultured at 37℃. The O.D. of the culture was determined at 620 nm with a UV-VISIBLE spectrophotometer (UV-1601, SHIMADZU Co., Japan)

Comparative Examples 6 to 8: Bile acid resistance test

As Comparative Examples 6 to 8, the procedure of Example 3 was repeated using *Lactobacillus acidophilus* CH-5, *Lactobacillus acidophilus* 145 and *Lactobacillus acidophilus* NCFM to test the bile acid resistance of the test strains.

The results of Example 3 and Comparative Examples 6 to 8 are shown in Figs. 3a to 3d.

Example 4: Cholesterol removing activity test

Lactobacillus acidophilus SNUL 01 of the present invention was inoculated at a concentration of 1 % to MRS liquid medium containing 0.3 % oxgall (Difco), 0.2 % thiocholic acid, and water soluble cholesterol (Sigma Co., 100 ug/ml). The cells were cultured at 37℃ for 24 hours and the amount of cholesterol remained in the medium was determined by the method of Rudel & Morris, J. Lipid Research, 1973, 14:364-366).

Comparative Examples 9 to 11:

The procedure of Example 4 was repeated using *Lactobacillus acidophilus* ATCC 43121, *Lactobacillus acidophilus* CH-5 and *Lactobacillus acidophilus* 145 to test the cholesterol removing activity of the test strains.

The results of Example 4 and Comparative Examples 9 to 11 are shown in Table 3 below.

[Table 3] Cholesterol removal (%)

	Strain	Cholesterol removal % after culture
Example 4	SNUL 01	41.17
Comparative Example 9	ATCC 43121	24.85
Comparative Example 10	CH-5	28.4
Comparative Example 11	145	24.85

Example 5: Growth test on MRS liquid medium

Lactobacillus acidophilus SNUL 01 of the present invention was inoculated at a concentration of 10^6 cfu/ml to sterilized MRS liquid medium and cultured at 37℃ for 24 hours. In order to examine the number of live cells according to the culture time, the culture was diluted, inoculated on MRS agar medium and cultured at 37℃ for 2 days, and the number of live cells was determined by counting the colonies formed on the medium.

Comparative Examples 12 to 14:

The procedure of Example 5 was repeated using *Lactobacillus acidophilus* CH-5, *Lactobacillus acidophilus* 145 and *Lactobacillus acidophilus* NCFM to determine the number of live cells.

The results of Example 5 and Comparative Examples 12 to 14 are shown in Fig. 4.

Example 6: Growth test on Milk

Lactobacillus acidophilus SNUL 01 of the present invention was inoculated at a concentration of 1 % to 12 % sterilized reduced skim milk and cultured at 37℃ for 24 hours. The culture was diluted, inoculated on MRS agar medium and cultured at 37℃ for 2 days, and the number of live cells was determined by counting the colonies formed on the medium.

Comparative Examples 15 and 16:

The procedure of Example 6 was repeated using *Lactobacillus acidophilus* CH-5 and *Lactobacillus acidophilus* NCFM to determine the number of live cells.

The results of Example 6 and Comparative Examples 15 and 16 are shown in Fig. 5.

EFFECT OF THE INVENTION

As clearly shown in the above explanation and examples, *Lactobacillus acidophilus* SNUL 01 of the present invention is characterized by its excellent acid and bile acid resistance and excellent activity for lowering blood cholesterol level, and high growth rate. Accordingly, when taken a food containing same, the inventive strain shows a higher survival rate in the small intestine than the existing strains. Specifically, the inventive strain has a high possibility of settlement in the intestine of Korean because it has been isolated from a healthy Korean adult.

Therefore, the inventive strain and the culture fluid or fermentation food containing the same is expected to have the effect of curing an intestine disorder and lowering the blood cholesterol level.

(57) CLAIMS

Claim 1
A lactic acid bacteria strain isolated from the feces of a Korean, which has an excellent acid and bile acid resistance, an excellent activity for lowering blood cholesterol level, and a high growth rate.

Claim 2
The lactic acid bacteria strain of claim 1, which is *Lactobacillus acidophilus* SNUL 01(Accession No.: KFCC-11041).

Claim 3
A fermentation product prepared by using the strain of claim 1.

Claim 4
A medicine for intestine disorder, which comprises the strain of claim 1.

THE DRAWINGS

Fig. 1

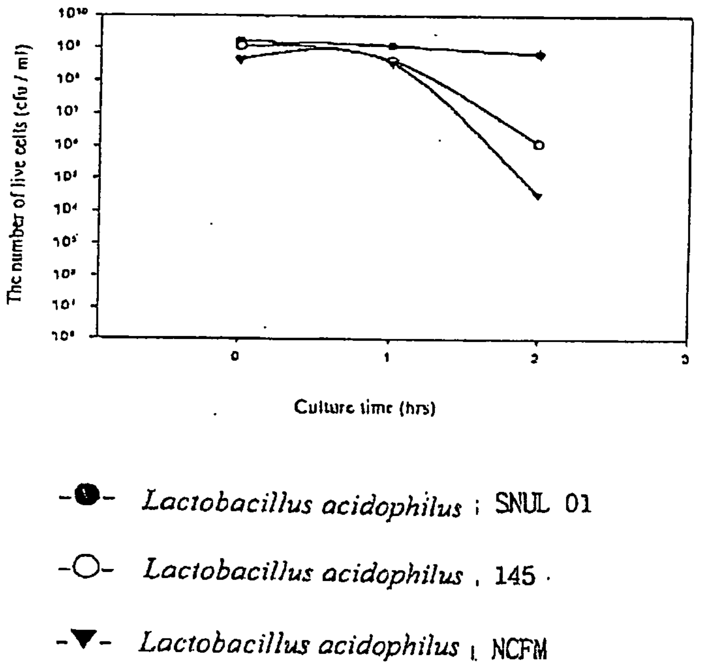
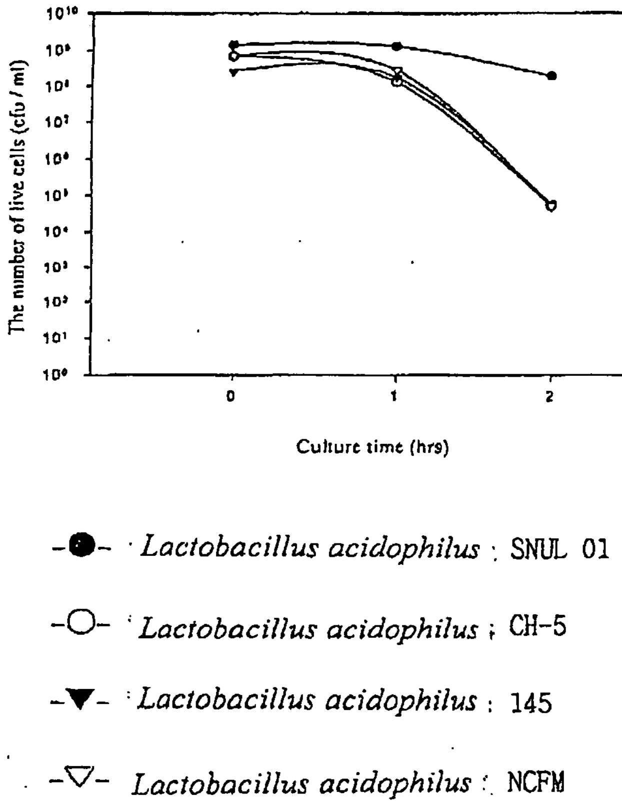
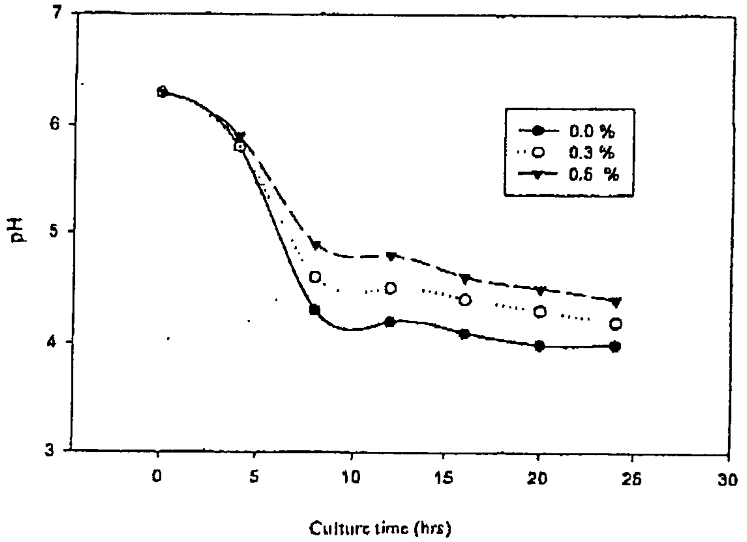


Fig. 2



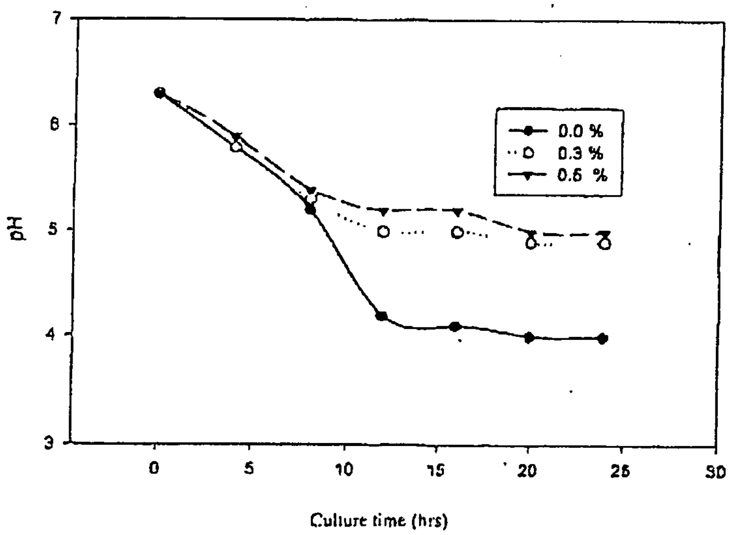
10^{10}
10^{9}
10^{8}
10^{7}
10^{6}
10^{5}
10^{4}
10^{3}
10^{2}
10^{1}
10^{0}
The number of live cells (cfu / ml)
0
1
2
3
Culture time (hrs)
-●- *Lactobacillus acidophilus* : SNUL 01
-○- *Lactobacillus acidophilus* : CH-5
-▼- *Lactobacillus acidophilus* : 145
-▽- *Lactobacillus acidophilus* : NCFM

Fig. 3a



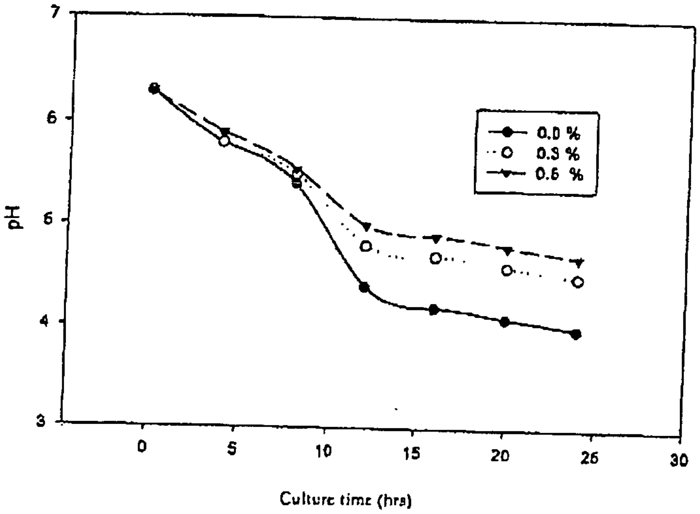
Lactobacillus acidophilus SNUL 01

Fig. 3b



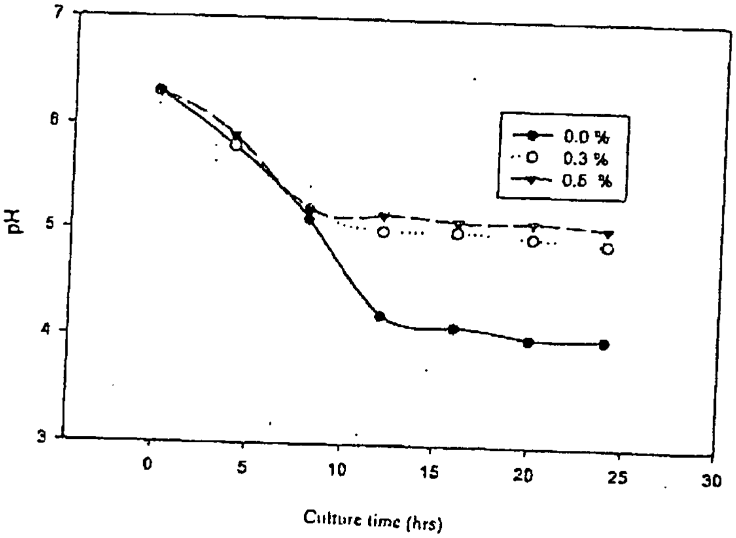
Lactobacillus acidophilus CH-5

Fig. 3c



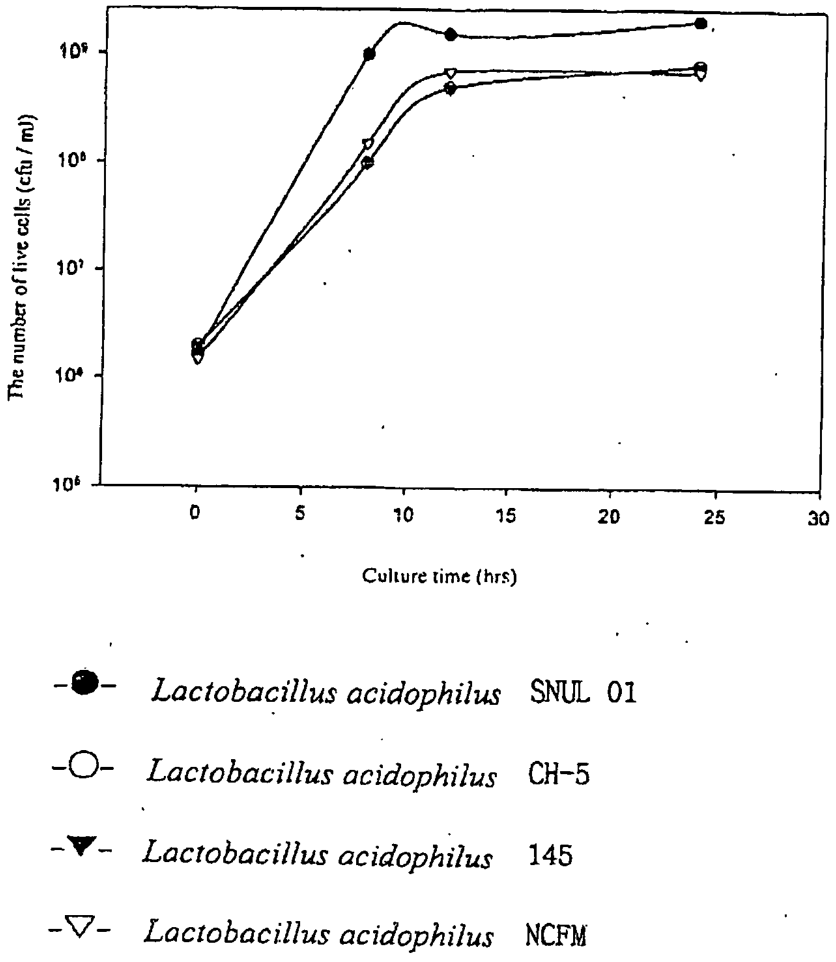
Lactobacillus acidophilus 145

Fig. 3d



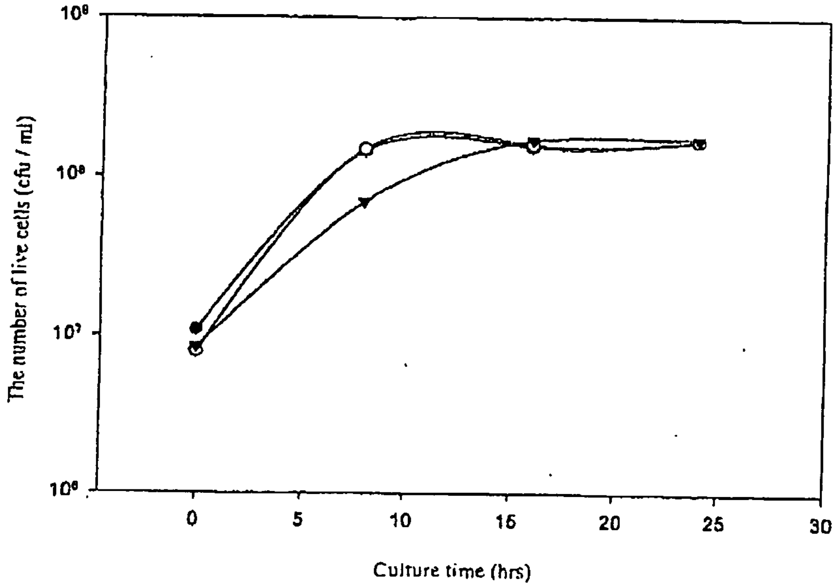
Lactobacillus acidophilus NCFM

Fig. 4



10^9
10^8
10^7
10^6
10^5
The number of live cells (cfu / ml)
0
5
10
15
20
25
30
Culture time (hrs)
-●- *Lactobacillus acidophilus* SNUL 01
-○- *Lactobacillus acidophilus* CH-5
-▼- *Lactobacillus acidophilus* 145
-▽- *Lactobacillus acidophilus* NCFM

Fig. 5



-●- *Lactobacillus acidophilus* SNUL 01

-○- *Lactobacillus acidophilus* CH-5

-▼- *Lactobacillus acidophilus* NCFM

This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning Operations and is not part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☑ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☑ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** ______________________

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.
As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.